

β_2 肾上腺素受体对 $A\beta_{1-40}$ 诱导阿尔茨海默病大鼠脑内胆碱能水平的影响

葛培兵¹, 丁高中¹, 戚晓红², 袁艺标¹, 周红^{1*}

(¹南京医科大学基础医学实验教学示范中心,²病理生理学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究 β_2 肾上腺素受体激动剂和抑制剂对阿尔茨海默病(AD)大鼠学习记忆能力和脑内乙酰胆碱含量的影响。方法:40 只健康雄性 SD 大鼠随机平均分为 4 组:对照组、AD 组、克伦特罗组和 ICI118,551 组。AD 组给予海马内注射 $A\beta_{1-40}$ 1 μ l(10 μ g),克伦特罗组和 ICI118,551 组同样注射 $A\beta_{1-40}$ 后分别腹腔注射克伦特罗 0.5 mg/kg 和 ICI118,551 1 mg/kg。对照组注射生理盐水。Y 迷宫检测各组大鼠的学习记忆能力后检测海马内胆碱酯酶(AChE)和乙酰转移酶(ChAT)的含量,Nissle 染色观察海马 CA1 区神经元的形态学改变。结果:与 AD 组相比,克伦特罗组的学习记忆能力明显下降($P < 0.01$),海马 ChAT、AChE 活力下降,CA1 区神经元凋亡明显($P < 0.01$);而 ICI118,551 组学习记忆能力、海马 ChAT、AChE 活力均较 AD 组提高,海马神经元的损伤情况较 AD 组有所改善($P < 0.05$)。结论: β_2 肾上腺素受体激动剂、抑制剂分别能加重和减轻 AD 病变,其机制可能与改变脑内胆碱能水平有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; β_2 肾上腺素受体;乙酰胆碱;学习记忆; β 样淀粉样蛋白

[中图分类号] R741

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)06-754-04

Effects of β_2 -adrenergic receptor on cholinergic system in Alzheimer's disease rats induced by $A\beta_{1-40}$

GE Pei-bing¹, DING Gao-zhong¹, QI Xiao-hong², YUAN Yi-biao¹, ZHOU Hong^{1*}

(¹Laboratory Center for Basic Medical Sciences, ²Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the agonist and inhibitor effects of β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) on learning and memory capacities and the level of acetylcholine in hippocampus of Alzheimer's disease(AD)rats. **Methods:** Forty healthy male Sprague Dawley rats were randomly and equally divided into 4 groups, ie, saline-injected group, AD group, clenbuterol group and ICI118,551 group. The AD rat model was established by amyloid- β_{1-40} ($A\beta_{1-40}$) injection into hippocampus. Then the clenbuterol group and ICI118,551 group were peritoneal injected by clenbuterol of 0.5 mg/kg and ICI118,551 of 1 mg/kg respectively for 20 days after they were injected $A\beta_{1-40}$ injection. The learning and memory ability were determined by Y-maze, and the activity of AChE and ChAT in hippocampus was tested by chemistry method. Nissle staining was used to verify neuron apoptosis. **Results:** Compared with the AD rats, the learning and memory ability of rats injected with clenbuterol were significantly decreased ($P < 0.01$), correspondingly, the activity of AChE and ChAT decreased. While in the rats of the ICI118,551 group, both their learning and memory ability and the activity of AChE and ChAT were increased compared with those in the AD rats ($P < 0.05$). **Conclusion:** The β_2 -AR agonist clenbuterol might aggravate the injury induced by $A\beta_{1-40}$, while the β_2 -AR selective antagonist ICI 118,551 can improve AD pathological process. These results suggested that the level of acetylcholine in brain tissue may be involved in the possible mechanisms of AD.

[Key words] Alzheimer's disease; β_2 -adrenergic receptor; acetylcholine; learning and memory; amyloid- β

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(6): 754-757]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金(08NMUM006);
南京医科大学“十二五”教育研究课题(NY222011030)

*通讯作者, E-mail: zhouhong2002@hotmail.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 是一种进行性神经退行性疾病, 主要临床表现有严重的记忆减退和认知障碍, 并以神经元纤维缠结、 β -淀粉样蛋白($A\beta$)沉积为主要病理改变^[1]。目前病因尚不

明确。最近研究显示,细胞膜上的 β₂ 肾上腺素受体(β₂-AR)激活后能促进 β 淀粉样蛋白沉积,加重 AD 病理改变^[2]。本研究通过给予 AD 模型鼠 β₂-AR 激动剂和抑制剂,从行为学、脑内胆碱能水平和形态学方面观察 β₂-AR 对 AD 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性健康 SD 大鼠 40 只,清洁级,体重 220~250 g(南京医科大学实验动物中心提供)。

淀粉样蛋白(Aβ₁₋₄₀)、β₂-AR 选择性激动剂克伦特罗、β₂-AR 选择性抑制剂 ICI118,551 和甲苯胺蓝(Sigma 公司,美国);Aβ₁₋₄₀ 在使用前将 500 μg 溶于 50 μl 灭菌的生理盐水中配成浓度 10 g/L,37℃ 孵育 7 d^[3-4];胆碱酯酶(AChE)和乙酰转移酶(ChAT)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

大鼠脑立体定位仪(SN3 型,日本),Y 迷宫和视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司),Laica 切片机,Nikon 光学显微镜。

1.2 方法

1.2.1 AD 模型制备及处理

将大鼠随机分为 4 组,分别为对照组、AD 组、克伦特罗组和 ICI118,551 组,每组 10 只。动物适应新环境 7 d 后再进行实验,水和食物自由获得。AD 组、克伦特罗组和 ICI118,551 组海马内注射 Aβ₁₋₄₀ 制备 AD 模型。大鼠用 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉后固定于脑立体定位仪上,颅顶剪毛,正中切口暴露前囟,参照 Paxinos and Watson^[5]大鼠脑立体定位图谱,海马坐标为:前囟后 3.5 mm,旁开 2.0 mm,硬脑膜下 3.0 mm。用微量进样器缓慢注入 Aβ₁₋₄₀ 1 μl(10 μg)^[6],留针 10 min 后缓慢退针。造模后,克伦特罗组每日给予腹腔注射克伦特罗 0.5 mg/kg^[2],ICI118,551 组给予每日腹腔注射 ICI118,551 1 mg/kg^[2],共 20 d。对照组海马及腹腔注射生理盐水。

1.2.2 行为学测试

用 Y 迷宫检测学习记忆能力。测试分 4 d 进行,前 3 d 练习,分早中晚 3 次,每次 15 min;第 4 天测试,规定大鼠受电击后直接从电击区跑至安全区为正确反应,连续 10 次测试中有 9 次或以上正确反应(9/10)为达到学会标准,以每只大鼠达到学会标准所需测试次数表示大鼠的学习记忆能力。若测试次数超过 90 次,则认为此大鼠无法学会,并以 90 次计数^[7]。

1.2.3 脑组织病理学观察

行为学测试结束后,各组取半数动物进行病理学观察。麻醉大鼠,经左心室灌注生理盐水和 4%多聚甲醛,再取出脑组织置于 4%多聚甲醛 24 h,于注射点前后各 2 mm 处取材,乙醇系列脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋、切片,片厚 4 μm。Nissle 染色:1%甲苯胺蓝染色 10 min^[8],用蒸馏水洗去浮色后入梯度乙醇脱水,二甲苯透明后中性树脂胶封片,光镜下观察海马 CA1 区神经元。在 200 倍镜下,运用体视学方法的测试网格进行细胞计数,取其平均值作为测量结果^[9]。

1.2.4 海马 ChAT、AChE 活性检测

取各组另半数动物进行检测。断头处死大鼠,于冰台上取出脑,分离海马组织称其质量,立即置于 4℃水浴中匀浆至糊状,加入 9 倍生理盐水制成 10%海马组织匀浆,4℃离心 10 min (4 000 r/min),取上清进行检测^[10]。按 ChAT、AChE 试剂盒操作说明测定 ChAT、AChE 活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS8.0 统计软件分析处理数据。实验数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计分析采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Y 迷宫检测

各组大鼠学习记忆测试结果见表 1。AD 组有 2 只大鼠无法学会,与对照组比较,AD 组的测试次数明显增多($P < 0.01$);克伦特罗组有 4 只大鼠无法学会,测试次数比 AD 组增多,差异显著($P < 0.01$);ICI118,551 组全部学会,所需测试次数减少,与 AD 组比较有差异($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 Y 迷宫测试结果

Table 1 The learning and memory ability of all groups determined by Y-maze ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

分组	达到学会标准所需次数
对照组	55.38 ± 6.63
AD 组	73.63 ± 8.99*
克伦特罗组	84.25 ± 6.20 [△]
ICI118,551 组	65.00 ± 5.40 [◆]

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 AD 组比较, [◆] $P < 0.05$, [△] $P < 0.01$ 。

2.2 海马 ChAT、AChE 检测结果

AD 组 ChAT、AChE 与对照组比较明显降低($P < 0.01$);与 AD 组比较,克伦特罗组的 ChAT 下降($P <$

0.05)、AChE 显著下降 ($P < 0.01$), 而 ICI118,551 组 ChAT、AChE 与 AD 组比较有所增高($P < 0.05$,表 2)。

表 2 各组大鼠海马 ChAT、AChE 活性比较

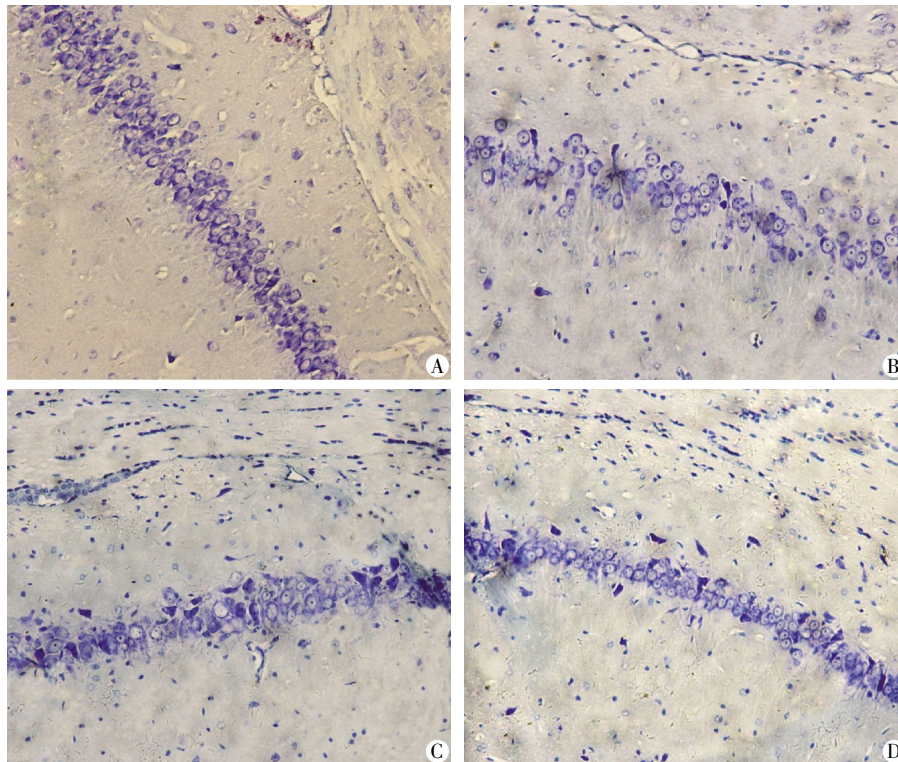
Table 2 The activity of ChAT and AChE in hippocampus of all groups ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

分组	ChAT(U/g)	AChE(U/mgprot)
对照组	124.04 ± 16.82	0.90 ± 0.07
AD 组	89.18 ± 6.52*	0.62 ± 0.02*
克伦特罗组	79.32 ± 9.93♦	0.28 ± 0.04 [△]
ICI118,551 组	101.28 ± 13.55♦	0.75 ± 0.10♦

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 AD 组比较, ♦ $P < 0.05$, [△] $P < 0.01$ 。

2.3 海马组织学观察

对照组海马 CA1 区神经元形态正常, 排列整齐, 核呈圆形或椭圆形, 尼氏体着色清晰(图 1)。AD 组神经元呈现不同程度的损伤变性, 表现为细胞数目减少, 排列稀疏, 部分神经元胞体缩小, 胞核固缩。克伦特罗组神经元损伤更严重, 数目明显减少, 排列紊乱, 部分细胞肿胀, 颗粒脱失, 尼氏体溶解。ICI118,551 组椎体细胞排列尚整齐, 少量细胞凋亡, 尼氏体数量较多, 着色清晰。各组 CA1 区神经元计数结果见表 3, AD 组神经元数目较对照组明显减少, 差异显著($P < 0.01$); 克伦特罗组神经元凋亡最明显, 存活细胞数与 AD 组比较差异显著($P < 0.01$); ICI118,551 组损伤有所改善, 细胞数较 AD 组增多($P < 0.05$)。



A: 对照组; B: AD 组; C: 克伦特罗组; D: ICI118,551 组。

图 1 海马 CA1 区尼氏染色($\times 20$)

Figure 1 Nissle staining of hippocampus CA1 region($\times 20$)

表 3 各组海马 CA1 区神经元计数

Table 3 The neuron numbers in hippocampus CA1 region of all groups (个, $n = 5, \bar{x} \pm s$)

分组	细胞计数
对照组	52.80 ± 6.79
AD 组	31.40 ± 3.51*
克伦特罗组	16.20 ± 3.77 [△]
ICI118,551 组	39.40 ± 6.27♦

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 AD 组比较, ♦ $P < 0.05$, [△] $P < 0.01$ 。

3 讨论

早在上世纪七八十年代研究者就发现 AD 患者脑中胆碱能神经元选择性退变, 从而提出“胆碱能”假说。尽管后来证明 AD 是一种发病机制非常复杂的疾病, 难以用一种假说解释清楚, 兴奋性神经毒素、淀粉样代谢异常、自由基损伤在发病过程中均起一定作用^[11], 但脑内胆碱能神经系统的退变被认为是造成 AD 的最重要病理因素之一^[12]。中枢胆碱

能递质在学习记忆行为中有重要的调节作用。ChAT 和 AChE 共同维持着乙酰胆碱的动态平衡, 故常作为研究胆碱能神经元的标志或估计乙酰胆碱含量(释放量)的间接指标^[13]。

本实验采用海马内注射 $A\beta_{1-40}$ 方法建立 AD 模型, 实验结果显示, AD 组动物的学习记忆能力和脑内 ChAT、AChE 水平与对照组比较明显降低 ($P < 0.01$); 同时, AD 组神经元呈现不同程度的损伤变性, 如神经细胞数目减少、神经元胞体缩小、胞核固缩等, 提示 AD 模型制备是成功的。

克伦特罗和 ICI118,551 是选择性 β_2 -AR 激动剂和抑制剂, 能够透过血脑屏障到达中枢。本实验结果显示, 克伦特罗能加重 AD 动物的海马神经元损伤, 降低其中枢胆碱能水平和学习记忆能力; 相反地, ICI118,551 则能改善 AD 动物的形态和功能异常, 提高中枢胆碱能系统水平。这些结果提示 β_2 -AR 可以通过改变中枢胆碱能水平影响 AD 的病理过程。

β_2 -AR 是一种 G 蛋白偶联受体(GPCRs), 它通过 Gs 蛋白, 调节腺苷酸环化酶(AC)的活性。它的几种亚型中, β_1 和 β_2 在全脑都有分布。当 β 受体被激活后, AC 促使 ATP 转变成 cAMP, 后者进一步激活蛋白激酶 A (PKA), PKA 能磷酸化多种突触前和突触后的蛋白底物, 从而调节突触强度。因此, β 受体-cAMP-PKA 通路可能在调节突触传递和突触可塑性中起着重要作用^[14-16]。目前有研究表明, 细胞膜上的 β_2 -AR 被激活后能够促进 γ -分泌酶从细胞膜表面向细胞内部的溶酶体转运, 增强 γ -分泌酶的活性, 进而增加 β 淀粉样蛋白的产生^[2]。

进一步深入研究以 β_2 -AR 为代表的 G 蛋白偶联受体对 AD 发生发展的调节作用, 不仅可以揭示环境、精神因素在 AD 中的分子生物学机制, 进一步阐明 AD 的发病机制, 同时也为有效治疗 AD 提供新的靶点药物。

[参考文献]

[1] Roberts BR, Ryan TM, Bush AI, et al. The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer's disease [J]. J Neurochem, 2012, 120(Suppl 1): 149-166

[2] Ni Y, Zhao XH, Bao GB, et al. Activation of β_2 -adrenergic receptor stimulates γ -secretase activity and accelerates amyloid plaque formation [J]. Nat Med, 2006, 12(12): 1390-1396

[3] 王敏, 张峰, 李晓红, 等. 褪黑素对 Alzheimer 病模型大鼠认知功能和海马 tau 蛋白过度磷酸化的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2007, 20(5): 374-376

[4] 姜礼红, 张一娜, 宋芳芳. 凝聚态海马 $A\beta_{1-40}$ 海马内注射致 AD 大鼠在体神经毒作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2007, 27(12): 1373-1375

[5] George P, Charles W. The rat brain in stereotaxic coordinates [M]. 5th ed. New York: Elsevier Academic Press, 2005: 26

[6] Yamaguchi Y, Kawashima S. Effects of amyloid- β_{25-35} on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat [J]. Eur J Pharmacol, 2001, 412(3): 265-272

[7] 刘辉, 陈俊抛, 田时雨, 等. 海马注射 β -淀粉样蛋白对大鼠学习记忆及局部神经元的损伤作用 [J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(3): 150-152

[8] 周君, 陈勤. 神经细胞尼氏体染色方法改良[J]. 生物学杂志, 2010, 27(5): 94-95

[9] 陈志勇, 杜天明, 陈善成. 人参皂苷 Rg1 对海马电损大鼠的学习记忆功能和海马神经细胞形态的影响[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(6): 1039-1042

[10] 汤颖, 李叙领, 王德生. 复智散对阿尔茨海默病模型小鼠认知功能及脑内胆碱能系统的影响[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(1): 1-3

[11] 韩太真, 吴馥梅. 学习与记忆的神经生物学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998: 146-226

[12] Fisher A. Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease [J]. J Neurochem, 2012, 120(Suppl 1): 22-33

[13] Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, et al. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease relative importance of the cholinergic deficits [J]. J Neurochem, 1995, 64(1): 746-760

[14] Oda Y. Choline acetyl transferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system [J]. Pathol Int, 1999, 49(11): 921-928

[15] Hall RA, Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor signaling by scaffold proteins [J]. Circ Res, 2002, 91(8): 672-680

[16] Wang D, Govindaiah G, Liu R, et al. Binding of amyloid beta peptide to beta2 adrenergic receptor induces PKA-dependent AMPA receptor hyperactivity [J]. FASEB J, 2010, 24(9): 3511-3521

[收稿日期] 2012-01-13